

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

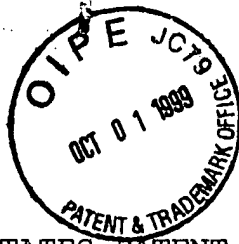
Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**





GP/64/111  
10/99

PATENT

ATTORNEY DOCKET NO. 06501/030001

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant : Hiroaki Yamamoto  
Serial No.: 09/305,390  
Filed : May 5, 1999  
Title : METHOD FOR PRODUCING OPTICALLY ACTIVE 4-HALO-3-HYDROXYBUTYRIC ACID ESTER

Art Unit: 1643  
Examiner:

Assistant Commissioner for Patents  
Washington, DC 20231

TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT(S) UNDER 35 U.S.C. §119

Applicant hereby confirms his claim of priority under 35 U.S.C. §119 from Japanese Applications No. 126507 filed May 8, 1998; 300178 filed October 21, 1998 and 098205 April 5, 1999. Certified copies of the applications from which priority is claimed are submitted herewith.

Please apply any charges or credits to Deposit Account No. 06-1050.

Respectfully submitted,

Date: 9-29-99

John T. Li  
John T. Li  
Reg. No. 44,210

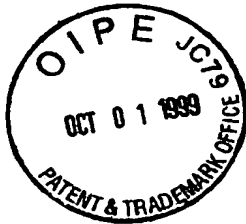
Fish & Richardson P.C.  
225 Franklin Street  
Boston, MA 02110-2804

Telephone: 617/542-5070  
Facsimile: 617/542-8906  
397622.B11

RECEIVED  
OCT 06 1999  
TECH CENTER 1600/2900

Date of Deposit: September 29, 1999  
I hereby certify under 37 CFR 1.8(a) that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as first class mail with sufficient postage on the date indicated above and is addressed to the Assistant Commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231.

Jeanine Mecherkany  
Jeanine Mecherkany



日 本 国 特 許 庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

RECEIVED  
OCT 06 1999  
TECH CENTER 1600/2900

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application:

1 9 9 8 年 5 月 8 日

出 願 番 号  
Application Number:

平成 1 0 年 特 許 願 第 1 2 6 5 0 7 号

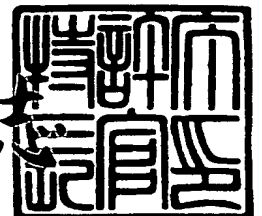
出 願 人  
Applicant (s):

ダイセル化学工業株式会社

1 9 9 9 年 8 月 3 1 日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Patent Office

伴 佐 山 建 志



出 証 番 号 出 証 特 平 1 1 - 3 0 6 1 3 8 8

【書類名】 特許願

【整理番号】 D1-003

【提出日】 平成10年 5月 8日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12P 7/62

【発明の名称】 光学活性 4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルの製造方法

【請求項の数】 5

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市千現 1-14-14-103

    【氏名】 山本 浩明

【発明者】

【特許出願人】

    【識別番号】 000002901

    【氏名又は名称】 ダイセル化学工業株式会社

    【代表者】 児島 章郎

【代理人】

    【識別番号】 100102978

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

    【識別番号】 100108774

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 041092

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

特平 10-126507

【物件名】	要約書	1
【プールの要否】	要	

【書類名】 明細書

【発明の名称】 光学活性 4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルの製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 II型の脂肪酸合成酵素を構成する  $\beta$ -ケトアシル-アシルキャリアープロテイン還元酵素を用い、4-ハロ-アセト酢酸エステル若しくはその誘導体を不斉還元することを特徴とする、(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルの製造方法。

【請求項 2】  $\beta$ -ケトアシル-アシルキャリアープロテイン還元酵素が大腸菌由来である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】  $\beta$ -ケトアシル-アシルキャリアープロテイン還元酵素が下記 (a) から (c) より選択される、請求項 1 に記載の方法。

(a) 配列番号：1 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) 配列番号：1 に記載のアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が付加、欠失若しくは置換したアミノ酸配列からなり、4-ハロ-アセト酢酸エステル若しくはその誘導体を不斉還元し、(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルを生成する活性を有するタンパク質。

(c) 配列番号：2 に記載の塩基配列からなる DNA とハイブリダイズする DNA がコードするタンパク質であって、4-ハロ-アセト酢酸エステル若しくはその誘導体を不斉還元し、(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルを生成する活性を有するタンパク質。

【請求項 4】 4-ハロアセト酢酸エステルが 4-クロロアセト酢酸エステルである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】 4-ハロアセト酢酸エステルが 4-クロロアセト酢酸エチルエステルである、請求項 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、II型の脂肪酸合成酵素を構成する  $\beta$ -ケトアシル-アシルキャリアープロテイン還元酵素を利用した (S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルの製造方

法に関する。

【0002】

【従来の技術】

従来、光学活性(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルの製造方法としては、3 $\alpha$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素を用いた不斉還元法（特開平1-277494号公報）、パン酵母など微生物を用いた不斉還元法（J. Am. Chem. Soc. 105, 5925-5926 (1983)、特開昭61-146191号公報等）などが知られている。パン酵母において4-ハロアセト酢酸エステルを還元し(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルを生成する酵素として、D-enzyme-1, D-enzyme-2（J. Org. Chem. 56, 4778-4783 (1991)）が報告されている。これらのうち、D-enzyme-2は、分子量などから脂肪酸合成酵素であることが示唆されている（J. Am. Chem. Soc. 107, 2993-2993 (1985)）。

【0003】

しかしながら、パン酵母を用いた4-ハロアセト酢酸エステルの還元による光学活性(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルの合成は、活性が低く、高濃度で蓄積させることが困難であり、また、パン酵母中に4-ハロアセト酢酸エステルを還元して(R)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルを生成する酵素が存在するため、高い光学純度の(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルを安定して合成することは困難である。

【0004】

また、パン酵母に於いて(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルの合成に主に関与している脂肪酸合成酵素は、ヨードアセトアミド、水銀、パラクロロ水銀安息香酸などのSH試薬により迅速に阻害されることが報告されており、基質である4-ハロアセト酢酸エステル、生成物である4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルにより阻害されることが予想され、(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルを高濃度で蓄積させるには好ましくない。

【0005】

さらに、パン酵母の脂肪酸合成酵素を遺伝子工学的手法を用いて、異種微生物などに於いて高発現し、高活性で、高い光学純度の(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪

酸エステルを合成することも考えられるが、パン酵母の脂肪酸合成酵素は、1894 アミノ酸で分子量20万8千の $\alpha$ -サブユニットと、2051アミノ酸で分子量22万9千の $\beta$ -サブユニット (J. Biol. Chem. 263, 12315-12325 (1988))が $\alpha 6 \beta 6$ の複合体を形成しており (J. Biol. Chem. 253, 4464-4475 (1978))、 $\beta$ -ケト基の還元活性 ( $\beta$ -ケトアシル-ACP還元活性) だけではなく、アシルキャリアープロテイン (ACP) 活性、ACP-S-アセチルトランスフェラーゼ活性、ACP-S-マロニルトランスフェラーゼ活性、 $\beta$ -ケトアシル-ACP合成酵素活性、 $\beta$ -ヒドロキシアシル-ACP脱水素酵素活性、エノイル-ACP還元酵素活性およびパルミチルトランスフェラーゼ活性の8種類の活性を有するきわめて複雑な多機能酵素であり、異種微生物で高発現させることは容易ではない。たとえば、大腸菌のミニセルで、FAS1, FAS2を発現させたが、全長鎖は検出できなかったと報告されている (Ann. Rev. Biochem. 52, 537-579 (1983))。

## 【0006】

また、脂肪酸合成酵素の中で、4-ハロアセト酢酸エステル還元酵素活性を担っていると予想される $\beta$ -ケトアシル-ACP還元活性を担うドメインは、 $\alpha$ -サブユニットに存在することがアミノ酸配列から示唆されているが、高塩濃度下での凍結融解 (Biochem. J. 109, 312-314 (1968)) やジメチルマレイン酸無水物 (dimethyl maleic anhydride) によるリジンの修飾により完全に解離させた $\alpha$ -サブユニット単独では $\beta$ -ケトアシル-ACP還元活性を示さないことが報告されている (Eur. J. Biochem. 94, 189-197 (1979))。また、アセト酢酸エチルエステル還元活性は $\alpha 6 \beta 6$ 構造の脂肪酸合成酵素では示さず、 $\alpha 2 \beta 2$ 構造 (分子量80万) でのみアセト酢酸エチルエステル還元活性を示すとの報告 (Eur. J. Biochem. 172, 633-639 (1988)) もあり、脂肪酸合成酵素の4-ハロアセト酢酸還元活性の発現にどの領域が必須であるか、また、4-ハロアセト酢酸エステル還元活性を示す構造 ( $\alpha 2 \beta 2$ ) を如何にして効率的に作製するかは明確ではない。

## 【0007】

## 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、脂肪酸合成酵素を構成する酵素を利用した、効率的な(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルの製造方法を提供することを課題とする。



## 【0008】

## 【課題を解決するための手段】

脂肪酸合成酵素は、その構造から以下の4つのタイプ (IA, IB, IC, II型) に分類される (新生化学実験講座4 脂質 I, p34-37)。ヒト (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92, 8695 (1995)) などの動物においては、分子量25万程度の $\alpha$ サブユニットのホモ二量体 (分子量約50万) が上記8種類の脂肪酸合成酵素活性全てを有するIA型を有する。パン酵母を含め酵母やカビに於いては、分子量約21万の $\alpha$ -サブユニットと約20万の $\beta$ -サブユニットが $\alpha 6 \beta 6$ 構造 (分子量約240万) を有し、 $\alpha 6 \beta 6$ 構造において、脂肪酸合成酵素活性全てを発現するIB型である。ブレビバクテリウム・アンモニアゲネス (*Brevibacterium ammoniagenes*, Eur. J. Biochem. 247, 268 (1997)) やミコバクテリウム・スメグマティス (*Mycobacterium smegmatis*, Physiol. Rev. 56, 339 (1976)) などの細菌では分子量約25万の $\alpha$ -サブユニットが $\alpha 6$ 構造を有し脂肪酸合成酵素活性全てを有するIC型を有する。セイヨウアブラナ (*Brassica napus*, Biochim. Biophys. Acta. 1120, 151 (1992)) などの植物や藻類、大腸菌 (*Escherichia coli*) などの細菌、放線菌、ウイルスなどにおいては、脂肪酸合成酵素を構成する個々の反応が別々の酵素蛋白質により行われているII型を有する。

## 【0009】

本発明者らは、これら種々の型の酵素の中で、II型の脂肪酸合成酵素に含まれる $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素が、I型酵素 (IA, IB, IC) に比べて構造並びに機能が単純で、分子量も小さく (サブユニットの分子量が20,000 - 40,000程度)、SH試薬で阻害されないという特徴を有することに着目し、該酵素が、パン酵母のIB型脂肪酸合成酵素同様に、4-ハロアセト酢酸エステルを還元して(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルを合成する活性を有すれば、(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルの高濃度での蓄積や遺伝子組換え技術を利用した(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステル高生産株の調製を行うことが可能であると考えた。

## 【0010】

そこで、本発明者らは、II型の脂肪酸合成酵素を構成する $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素の単離、およびその4-ハロアセト酢酸エステルに対する還元活性の検討

を試みた。具体的には、塩基配列が報告されている大腸菌の $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素遺伝子が大腸菌染色体DNAを鋳型としたポリメラーゼ連鎖反応を行うことによりによりクローニングし、次いで、単離した遺伝子が大腸菌に導入して組み換え酵素を大腸菌内で高発現させ、該酵素の4-クロロアセト酢酸エステル還元活性の検討を行った。その結果、本発明者らは、該酵素が、(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルに対し極めて高い還元活性および立体選択性を有することを見いだした。

【0011】

また、大腸菌の $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素は、 $\beta$ -ヒドロキシブチル-ACPに対して、D体特異的に酸化活性を示すことが報告されている(J. Biol. Chem. 240, 618-621 (1965))が、本発明者らは、該酵素が、4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルエステルに対しては、いずれの立体配置に対してもほとんど酸化活性を示さず、4-クロロアセト酢酸エチルに対しては還元のみを行うことを見出した。この性質は、不斉還元による光学活性(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステル合成において、平衡が律速とならないため、極めて好ましい性質である。

【0012】

すなわち、本発明は、II型の脂肪酸合成酵素を構成する酵素である $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素を4-ハロアセト酢酸エステル若しくはその誘導体に作用させて、(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルを生産する方法に関し、より具体的には、

(1) II型の脂肪酸合成酵素を構成する $\beta$ -ケトアシル-アシルキャリアープロテイン還元酵素を用い、4-ハロ-アセト酢酸エステル若しくはその誘導体を不斉還元することを特徴とする、(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルの製造方法

(2)  $\beta$ -ケトアシル-アシルキャリアープロテイン還元酵素が大腸菌由来である、(1)に記載の方法、

(3)  $\beta$ -ケトアシル-アシルキャリアープロテイン還元酵素が下記(a)から(c)より選択される、(1)に記載の方法、

(a) 配列番号：1に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) 配列番号：1 に記載のアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が付加、欠失若しくは置換したアミノ酸配列からなり、4-ハロ-アセト酢酸エステル若しくはその誘導体を不斉還元し、(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルを生成する活性を有するタンパク質。

(c) 配列番号：2 に記載の塩基配列からなる DNA とハイブリダイズする DNA がコードするタンパク質であって、4-ハロ-アセト酢酸エステル若しくはその誘導体を不斉還元し、(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルを生成する活性を有するタンパク質。

(4) 4-ハロアセト酢酸エステルが4-クロロアセト酢酸エステルである、(1) に記載の方法、

(5) 4-ハロアセト酢酸エステルが4-クロロアセト酢酸エチルエステルである、(1) に記載の方法、に関する。

#### 【0013】

##### 【発明の実施の形態】

本発明の(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルの生産方法においては、II型の脂肪酸合成酵素を構成する酵素(E.C 1.1.1.100)を用いることを特徴とする。II型の脂肪酸合成酵素を構成する酵素(E.C 1.1.1.100)は、 $\alpha$ -サブユニットのホモ二量体が脂肪酸合成酵素の多様な活性全てを有するIA型、 $\alpha$ -サブユニットと $\beta$ -サブユニットの $\alpha 6 \beta 6$ 構造が脂肪酸合成酵素の多様な活性全てを有するIB型、 $\alpha$ -サブユニットの $\alpha 6$ 構造が脂肪酸合成酵素の多様な活性全てを有するIC型に比して、構造並びに機能が単純で、分子量も小さく(サブユニットの分子量が20,000 - 40,000程度)、SH試薬で阻害されないという特徴を有する。このため、(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルの高濃度蓄積や遺伝子組換え技術を利用した(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステル高生産株の造成に有利であり好ましい。

#### 【0014】

用いる酵素の由来に特に制限はない。大腸菌由来の $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素(配列番号：1)の他、他の種々の生物由来の酵素を用いることも可能である。他の生物由来の酵素としては、たとえば、アクチノバチルス・アクチノミセテム

コミタンス (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 230, 220-225 (1997))、バチルス・ズブチルス (*Bacillus subtilis*, *J. Bacteriol.* 178, 4794-4800 (1996))、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* 267, 5751-5754 (1992))、ミコバクテリウム・ボビス (*Mycobacterium bovis*, *Science* 263, 227-230 (1994))、ミコバクテリウム・スメグマティス (*Mycobacterium smegmatis*, DDBJ Accession number U66800)、ミコバクテリウム・ツベルクロシス (*Mycobacterium tuberculosis*, *Mol. Microbiol.* 15, 1009-1015 (1995))、プロピオニバクテリウム・シャーマニー (*Propionibacterium shermanii*, *J. Gen. Microbiol.* 127, 121-129 (1981))、ストレプトコッカス・プノイモニエ (*Streptococcus pneumoniae*, W097/43303)、シネコシスティス属 (*Synechocystis* sp., *DNA Res.* 3, 109-136 (1996))、サーモトガ・マリティマ (*Thermotoga maritima*, *J. Bacteriol.* 178, 248-257 (1996))、ビブリオ・ハーベイ (*Vibrio harveyi*, *J. Bacteriol.* 178, 571-573 (1996))、ヘモフィラス・インフルエンザ (*Haemophilus influenza*, *Science* 269, 496-512 (1995)) など由来の  $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素が挙げられる。また、植物由来の  $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素としては、ネギ (*Allium porrum*, *Plant Physiol.* 115, 501-510 (1997))、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*, *Biochem. J.* 283, 321-326 (1992)、*Plant Physiol.* 115, 501-510 (1997))、セイヨウアブラナ (*Brassica napus*, W096/02652)、サフラワー (*Carthamus tinctorius*, *Arch. Biochem. Biophys.* 217, 144-154 (1982))、クフィア・ランシオレータ (*Cuphea lanceolata*, *Mol. Gen. Genet.*, 233, 122-128 (1992))、大麦 (*Hordeum vulgare*, *Plant Physiol.* 115, 501-510 (1997))、アボカド (*Persea americana*, *Biochem. J.*, 271, 713-720 (1990))、人参 (*carrot*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 300, 157-163 (1993))、ユーグレナ・グラシリス (*Euglena gracilis*, *J. Biol. Chem.*, 255, 1504-1508 (1980))、ホウレンソウ (*Spinacia oleracea*, *Plant Physiol.*, 69, 1257-1262 (1982))、トウモロコシ (*Zea mays* L., *Plant Physiol.*, 115, 501-510 (1997)) 由来の  $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素などが挙げられる。

【0015】

$\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素をコードする遺伝子は、例えば、ハイブリダイゼーション技術を利用して単離することが可能である。例えば、大腸菌由来の $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素をコードするDNA（配列番号：2）若しくはその一部をプローブとして他の生物から調製したDNAに対しストリンジントな条件下でハイブリダイゼーションを行うことにより、種々の生物由来の $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素を単離することが可能である。また、ポリメラーゼ連鎖反応を利用して単離することも可能である。例えば、 $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素をコードする遺伝子の中でホモロジーの高い領域（NADPH結合領域、大腸菌由来の $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素の10位から34位のアミノ酸など）からプライマーをデザインし、ポリメラーゼ連鎖反応により、特定の生物の染色体DNAもしくはcDNAを鋳型として、 $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素をコードする遺伝子を種々の生物から単離することも可能である。

## 【0016】

本発明の方法においては、天然型の酵素のみならず、天然型の酵素と同等の活性を有する限り、天然型酵素のアミノ酸配列に対してアミノ酸の変異した酵素を用いることも可能である。タンパク質中のアミノ酸に変異を導入してタンパク質の改変を行う方法としては、例えば、BAL31エキソヌクレアーゼIIIを用いる方法、Kunkel法、PCRを用いる方法（ラボマニュアル遺伝子工学第3版p219-p230、丸善株式会社）が当業者によく知られている。また、アミノ酸の変異は自然界において生じることもあり、人工的にアミノ酸を変異した酵素のみならず、自然界においてアミノ酸が変異した酵素も本発明の方法において用いることが可能である。

## 【0017】

また、本発明の方法においては、 $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素にホモロジーを有し、脂肪酸合成と同様な機構で生合成されるポリケチドやポリ-D-3-ヒドロキシ酪酸などの生合成に関与する遺伝子も、その産物である酵素（ $\beta$ -ケトアシル還元酵素、E.C 1.3.1.-やアセトアセチル-CoA還元酵素、E.C 1.1.1.36など）が、4-ハロアセト酢酸エステルを還元し、(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステル生成する活性を有する限り、好適に利用することができる。

【0018】

本発明において「 $\beta$ -ケトアシル-アシルキャリアープロテイン還元酵素を用い、4-ハロ-アセト酢酸エステル若しくはその誘導体を不斉還元する」とは、精製酵素を用いて還元反応を行う場合に限定されず、本酵素を含む微生物菌体、植物、または、その処理物を用いる場合も含まれる。本発明の方法においては、特に、 $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素をコードする遺伝子を遺伝子組換え技術を用いて同種もしくは異種の宿主中で高発現させた生物、もしくはその処理物を用いることが好ましい。なお、 $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素を有する生物が、4-ハロアセト酢酸エステル若しくはその誘導体を還元し、(R)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルを合成する酵素を併せ持つ場合には、これら(R)体を生成する酵素を自然変異、人工変異、遺伝子組換え技術などを利用して欠損させた欠損株を利用することが好ましい。

【0019】

本発明において $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素遺伝子を発現させるために、形質転換の対象となる宿主微生物は、 $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素活性を有するポリペプチドをコードするDNAにより形質転換され、 $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素活性を発現することができる微生物であれば特に制限はなく、具体的には、エシェリヒア(*Escherichia*)属、バチルス(*Bacillus*)属、シュードモナス(*Pseudomonas*)属、セラチア(*Serratia*)属、ブレビバクテリウム(*Brevibacterium*)属、コリネバクテリイウム(*Corynebacterium*)属、ストレプトコッカス(*Streptococcus*)属、ラクトバチルス(*Lactobacillus*)属など宿主ベクター系の開発されている細菌、サッカロマイセス(*Saccharomyces*)属、クライベロマイセス(*Kluyveromyces*)属、シゾサッカロマイセス(*Schizosaccharomyces*)属、チゴサッカロマイセス属(*Zygosaccharomyces*)、ヤロウイア(*Yarrowia*)属、トリコスポロン(*Trichosporon*)属、ロドスポリジウム(*Rhodospiridium*)属、ハンゼヌラ(*Hansenula*)属、ピキア(*Pichia*)属、キャンディダ(*Candida*)属などの酵母、ノイロスポラ(*Neurospora*)属、アスペルギルス(*Aspergillus*)、セファロスポリウム(*Cephalosporium*)属、トリコデルマ(*Trichoderma*)属などに属するカビなどが含まれる。

【0020】

形質転換体の作製のための手順および方法は、分子生物学、生物工学、遺伝子工学の分野において慣用されている技術に準じて行うことができる（例えば、Sambrookら、モレキュラー・クローニング、Cold Spring Harbor Laboratories）。微生物中などにおいて、本発明の $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素遺伝子を発現させるためには、まず微生物中において安定に存在するプラスミドベクターやファージベクター中にこの遺伝子を導入し、その遺伝情報を転写・翻訳させる必要がある。そのためには、転写・翻訳を制御するユニットにあたるプロモーターを本発明のDNAの5'側上流に、ターミネーターを3'側下流に、それぞれ組み込めばよい。このプロモーター、ターミネーターとしては、宿主として利用する微生物中において機能することが知られているプロモーター、ターミネーターを用いることができる。これら各種微生物において利用可能なベクター、プロモーター、ターミネーターなどに関して「微生物学基礎講座 8 遺伝子工学・共立出版」、特に酵母に関しては、Adv. Biochem. Eng. 43, 75-102 (1990), Yeast 8, 423-488 (1992) などに詳細に記述されている。

## 【0021】

例えば、エシェリヒア属、特に大腸菌(*Escherichia coli*)においては、プラスミドベクターとして、pBR, pUC 系プラスミドを利用でき、lac( $\beta$ -ガラクトシダーゼ), trp(トリプトファンオペロン), tac(lac, trp の融合),  $\lambda$ ファージ P<sub>L</sub>, PR などに由来するプロモーターなどが利用できる。また、ターミネーターとしては、trpA 由来、ファージ由来 rrnB リボソーマルターミネーターなどを用いることができる。

## 【0022】

バチルス属においては、ベクターとしてpUB110系プラスミド、pC194系プラスミドなどが利用可能であり、染色体にインテグレートすることもできる。また、プロモーター、ターミネーターとして apr(アルカリプロテアーゼ), npr(中性プロテアーゼ), amy( $\alpha$ -アミラーゼ)などが利用できる。

## 【0023】

シュードモナス属においては、シュードモナス・プチダ(*Pseudomonas putida*)、シュードモナス・セパシア(*Pseudomonas cepacia*)などで宿主ベクター系が開

発されており、トルエン化合物の分解に関与するプラスミド TOL プラスミドを基本にした広宿主域ベクター(RSF1010 などに由来する自律的複製に必要な遺伝子を含む) pKT240 などが利用可能であり、プロモーター、ターミネーターとして、リパーゼ(特開平5-284973) 遺伝子などが利用できる。

【0024】

ブレビバクテリウム属、特に、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム(*Brevibacterium lactofermentum*)においては、pAJ43 (Gene 39, 281 (1985))などのプラスミドベクターが利用可能であり、プロモーター、ターミネーターとしては、大腸菌で使用されているプロモーター、ターミネーターがそのまま利用可能である。

【0025】

コリネバクテリウム属、特に、コリネバクテリウム・グルタミカム(*Corynebacterium glutamicum*)においては、pCS11 (特開昭57-183799), pCB101(Mol. Gen. Genet. 196, 175 (1984) などのプラスミドベクターが利用可能である。

【0026】

ストレプトコッカス(*Streptococcus*)属においては、pHV1301 ((FEMS Microbiol. Lett. 26, 239 (1985)), pGK1 (Appl. Environ. Microbiol. 50, 94 (1985)) などがプラスミドベクターとして利用可能である。

【0027】

ラクトバチルス(*Lactobacillus*)属においては、ストレプトコッカス属用に開発された pAM $\beta$ 1 (J. Bacteriol. 137, 614 (1979)) などが利用可能であり、プロモーターとして大腸菌で利用されているものが利用可能である。

【0028】

サッカロマイセス(*Saccharomyces*)属、特にサッカロマイセス・セレビジアエ(*Saccharomyces cerevisiae*)においては、YRp系, YEp系, YCp系, YIp系プラスミドが利用可能であり、染色体内に多コピー存在するリボソームDNAとの相同組換えを利用したインテグレーションベクター (EP 537456 など) は、多コピーで遺伝子を導入でき、かつ安定に遺伝子を保持できるため極めて有用である。また、ADH(アルコール脱水素酵素), GAPDH(グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素



), PHO(酸性フォスファターゼ), GAL( $\beta$ -ガラクトシダーゼ), PGK(ホスホグリセレートキナーゼ), ENO(エノラーゼ)などのプロモーター、ターミネーターが利用可能である。

【0029】

クライベロマイセス属、特にクライベロマイセス・ラクティス(*Kluyveromyces lactis*)においては、サッカロマイセス・セレビジアエ由来 2 $\mu$ m系プラスミド, pKD1 系プラスミド (J. Bacteriol. 145, 382-390 (1981)), キラー活性に關与する pGK11 由来プラスミド, クライベロマイセス属における自律増殖遺伝子 KARS 系プラスミド, リボソームDNAなどとの相同組換えにより染色体中にインテグレート可能なベクタープラスミド (EP 537456 など) などが利用可能である。また、ADH, PGK などに由来するプロモーター、ターミネーターが利用可能である。

【0030】

シゾサッカロマイセス(*Schizosaccharomyces*)属においては、シゾサッカロマイセス・ポンベ由来の ARS (自律複製に關与する遺伝子)及び サッカロマイセス・セレビジアエ由来の栄養要求性を相補する選択マーカ-を含むプラスミドベクターが利用可能である (Mol. Cell. Biol. 6, 80 (1986))。また、シゾサッカロマイセス・ポンベ由来の ADH プロモーターなどが利用できる (EMBO J. 6, 729 (1987))。

【0031】

チゴサッカロマイセス属(*Zygosaccharomyces*)においては、チゴサッカロマイセス・ロウキシ (*Zygosaccharomyces rouxii*)由来の pSB3 (Nucleic Acids Res. 13, 4267 (1985)) などに由来するプラスミドベクターが利用可能であり、サッカロマイセス・セレビジアエ由来 PH05 プロモーターや、チゴサッカロマイセス・ロウキシ由来 GAP-Zr(グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素)のプロモーター (Agri. Biol. Chem. 54, 2521 (1990)) などが利用可能である。

【0032】

ハンゼヌラ(*Hansenula*)属においては、ハンゼヌラ・ポリモルファ(*Hansenula polymorpha*)において宿主ベクター系が開発されている。ベクターとしては、ハ

ンゼヌラ・ポリモルファ由来自律複製に関与する遺伝子 (HARS1, HARS2) も利用可能であるが、比較的不安定であるため、染色体への多コピーインテグレーションが有効である (Yeast 7, 431-443 (1991))。また、メタノールなどで誘導される AOX (アルコールオキシダーゼ), FDH (ギ酸脱水素酵素) のプロモーターなどが利用可能である。

【0033】

ピキア (Pichia) 属においては、ピキア・パストリス (Pichia pastoris) などにピキア由来自律複製に関与する遺伝子 (PARS1, PARS2) などを利用した宿主ベクター系が開発されており (Mol. Cell. Biol. 5, 3376 (1985))、高濃度培養とメタノールで誘導可能な AOX など強力なプロモーターが利用できる (Nucleic Acids Res. 15, 3859 (1987))。

【0034】

キャンディダ (Candida) 属においては、キャンディダ・マルトーサ (Candida maltosa)、キャンディダ・アルビカンス (Candida albicans)、キャンディダ・トロピカリス (Candida tropicalis)、キャンディダ・ウチルス (Candida utilis) などにおいて宿主ベクター系が開発されている。キャンディダ・マルトーサにおいてはキャンディダ・マルトーサ由来ARSがクローニングされ (Agri. Biol. Chem. 51, 1587 (1987))、これを利用したベクターが開発されている。また、キャンディダ・ウチルスにおいては、染色体インテグレートタイプのベクターは強力なプロモーターが開発されている (特開平8-173170号公報)。

【0035】

アスペルギルス (Aspergillus) 属においては、アスペルギルス・ニガー (Aspergillus niger)、アスペルギルス・オリジー (Aspergillus oryzae) などがカビの中で最もよく研究されており、プラスミドや染色体へのインテグレーションが利用可能であり、菌体外プロテアーゼやアミラーゼ由来のプロモーターが利用可能である (Trends in Biotechnology 7, 283-287 (1989))。

【0036】

トリコデルマ (Trichoderma) 属においては、トリコデルマ・リーゼイ (Trichoderma reesei) を利用した宿主ベクター系が開発され、菌体外セルラーゼ遺伝子由

来プロモーターなどが利用できる (Biotechnology 7, 596-603 (1989))。

【0037】

形質転換体の培養、および形質転換体からの組み換えタンパク質の精製は、当業者に公知の方法により行うことができる。

【0038】

本発明の方法において用いられる上記酵素の基質としては、4-ハロ-アセト酢酸エステルまたはその誘導体を用いられる。誘導体としては、例えば、 $\alpha$ 位に置換を有するものが挙げられる。基質としては、特に、4-クロロアセト酢酸エステルおよび4-クロロアセト酢酸エチルエステルが好ましい。本発明の方法において用いる基質の濃度は、通常、0.1~20%であり、好ましくは1~10%である。また、用いる酵素量は、通常、0.01~500U/ml-反応液であり、好ましくは0.1~50U/ml-反応液である。反応系には用いる酵素の要求する補酵素 (NADPHもしくはNADH) を基質に対して0.0001~5当量、好ましくは0.001~1当量を必要に応じて添加する。反応系の溶媒には、例えば、pHを維持するための緩衝液 (例えば、リン酸緩衝液) を用いることができる。また、オクタン、ヘキサン、トルエン、酢酸エチル、酢酸n-ブチル、クロロホルムなどの有機溶媒を10~90%含む水系の2相系を用いることもできる。反応温度は、通常、4~50℃、好ましくは10~30℃である。反応pHは、通常、5~9、好ましくは5.5~8.0である。反応により生成する(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルは、酢酸エチル、オクタンなどの生成物を溶解する能力の高い有機溶媒で抽出し、蒸留などの方法で精製することができる。

【0039】

なお、反応においては、適宜、還元反応に付随してNADPHから生成する $\text{NADP}^+$ を、NADPHへ再生する (ポリケチドの生合成などに関与する $\beta$ -ケトアシル還元酵素では、NADPHではなく、NADHが利用される)。これら補酵素の再生には、微生物の持つ $\text{NAD(P)}^+$ 還元能 (解糖系など) を用いて行うことができる。これら $\text{NAD(P)}^+$ 還元能は、反応系にグルコースやエタノールを添加することにより増強させることが可能である。また、 $\text{NAD(P)}^+$ から $\text{NAD(P)H}$ を生成する能力を有する微生物やその処理物、酵素を反応系に添加することによっても行うことができる。たとえば、

グルコース脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素、グルタミン酸脱水素酵素、ギ酸脱水素酵素を含む微生物、その処理物、もしくは精製酵素を用いてNAD(P)Hの再生を行うことができる。さらに、これらNAD(P)H再生能を有する酵素を、 $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素もしくは $\beta$ -ケトアシル還元酵素生産能を有する生物中で遺伝子組換え技術を利用して高発現させた生物もしくはその処理物を利用することができる。

## 【0040】

## 【実施例】

以下、実施例により本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

【実施例1】大腸菌の $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素遺伝子の取得

大腸菌 (*Escherichia coli*) JM109株をLB培地 (Bacto-Tryptone 10g, Bacto-Yeast extract 5 g, NaCl 10 g/L) で培養し、得られた菌体よりQiagen Genomic-tip (Qiagen社製) を用いて、染色体DNAを調製した。大腸菌の $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素遺伝子 (*fabG*) (J. Biol. Chem. 267, 5751-5754(1992)) をPCRクローニングするために、構造遺伝子の5'末端、3'末端の配列を元にプライマーECR-ATG1 (5'-AAAGGATCCAACAATGAATTTTGAAGGAAAAATCGC-3'、配列番号: 3) 及びECR-TAG1 (5'-TGCCTCGAGTTATCAGACCATGTACATCCCGC-3'、配列番号: 4) を合成した。大腸菌の染色体DNAを鋳型とし、ECR-ATG1, ECR-TAG1をプライマーとして、PCR (95℃, 30秒、50℃, 1分、75℃, 2分) を30サイクル行い、特異的な増幅サンプルを得た。

## 【0041】

得られたDNA断片をBamHI, XhoIの2種類の制限酵素で2重消化した。プラスミドベクターpSE420 (Invitrogen社製) をNcoI, BamHIで二重消化し、クレノウ断片処理後、自己環化反応を行い、pSE420Bを得た。pSE420BをBamHI, XhoIで2重消化し、同じ制限酵素で2重消化したPCR増幅断片とT4DNAリガーゼにより連結し、pSE-ECR1を得た。得られたプラスミド中の挿入断片は塩基配列を解析し、*fabG*遺伝子であることを確認した。なお、*fabG*遺伝子の塩基配列を配列番号: 2に、該遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列を配列番号: 1に示す。

【実施例 2】 大腸菌の  $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素遺伝子の発現

pSE-ECR1で形質転換した大腸菌 HB101株 (E.coli HB101 (pSE-ECR1)) をアンピシリン 50 mg/Lを含むLB培地5mLで終夜培養後、IPTGを0.1 mM添加し、更に5時間培養した。得られた菌体を集菌後、ミニビートピーター8 (BIOSPEC社製) で破碎し、遠心分離した上清を無細胞抽出液とした。

【実施例 3】  $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素の還元活性

実施例 2 で得られた無細胞抽出液を用い、4-クロロアセト酢酸エチル、アセト酢酸エチル、アセトアセチル-コエンザイムAを基質とした還元活性を測定した。

【0042】

還元活性の測定は、50 mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 6.5)、0.2 mM NADPH、20 mM4-クロロアセト酢酸エチル (もしくは、20 mMアセト酢酸エチル、0.2 mMアセトアセチルコエンザイムA) 及び酵素を含む反応液中で、25℃で反応させた。1 Uは、1分間に1  $\mu$ molのNADPHの減少を触媒する酵素量とした。測定結果を表1に示した。なお、表中の「ECAA」は4-クロロアセト酢酸エチルエステルを、「EAA」はアセト酢酸エチルエステルを、「AASCoA」はアセトアセチル-コエンザイムAを示す。また、「R」は還元活性、「DH」は脱水素酵素活性を示す。

【0043】

【表 1】

	NADPH ECAA-R	NADPH- AASCoA-R	NADPH- EAA-R	NADP <sup>+</sup> -R- ECHB-DH	NADP <sup>+</sup> -S- ECHB-DH
無細胞抽出液	100%	116%	1.90%	0.010%	0.004%

$\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素を発現させた無細胞抽出液では、NADPH依存的に4-クロロアセト酢酸エチルエステル還元活性を示し、その比活性は、0.90 U/mg-蛋白質であった。なお、プラスミドpSE-ECR1を含まないHB101株のみでは同様に培養した菌体でほとんど4-クロロアセト酢酸エチルエステル還元活性を示さなかった。

## 【0044】

アセトアセチル-コエンザイムAに対する活性は、4-クロロアセト酢酸エチルエステル還元活性と同程度であったが、クロロ基を有しないアセト酢酸エチルに対してはほとんど活性を示さなかった。

【実施例4】 $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素の酸化活性

実施例2で得られた無細胞抽出液を用い、(S)もしくは(R)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルエステルに対する酸化活性を測定した。酸化活性の測定は、50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 9.0)、2.5 mM  $\text{NADP}^+$ 、20 mM 4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチル及び酵素を含む反応液中で、25℃で反応させた。1Uは、1分間に1  $\mu\text{mol}$  のNADPHの増加を触媒する酵素量とした。反応結果を表1に示す。表1に示したように、いずれの基質に対してもほとんど酸化活性を示さなかった。なお、表中の「ECHB」は4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルエステルを示す。

【実施例5】 $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素の4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルに対する立体選択性

200 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.5)、146 mM NADPH、2% 4-クロロアセト酢酸エチル (122 mM) 及び実施例2で調製した $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素2 Uを含む1 mLの反応液を用い、20℃で1晩反応させた。

## 【0045】

反応液の一部を0.1 N塩酸で2倍希釈し、ガスクロマトグラフィーにより生成した4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルエステルを定量した。ガスクロマトグラフィーは、サーモン3000クロモソルブW (2 m、信和化工社製)、カラム温度 150℃、検出温度 250℃の条件で、水素炎イオン化検出器 (FID) により行った。その結果、4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルエステル濃度は13.3 g/Lであり、収率は66.3%であった。

## 【0046】

光学純度の測定は、反応液から4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルを酢酸エチルで抽出し、脱溶媒した後、光学分割カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー (カラム、ダイセル化学製キラルセルOD; 移動相、n-ヘキサン/イソプロパノール (9/2); RI検出; 流速, 0.5 mL/分) により測定した。その結果、光学純度

は96.5% ee (S) 以上であった。

【0047】

[実施例 6]  $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素による4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルエステルの合成

200 mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 6.5)、2% 4-クロロアセト酢酸エチルエステル (122 mM)、1.0mM NADPH、 $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素1 U、250mM グルコース、10 U グルコース脱水粗酵素 (和光純薬社製) を含む1 mLの反応液を用い、25℃で16時間反応させた。分析を実施例 5 の方法により行った結果、98.4%の収率で、95.4% ee (S) 以上の4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルエステルが合成された。

【0048】

【発明の効果】

本発明により、II型の脂肪酸合成酵素を構成する $\beta$ -ケトアシル-アシルキャリアープロテイン還元酵素を利用した光学活性(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルの生産方法が提供された。II型の脂肪酸合成酵素を構成する $\beta$ -ケトアシル-アシルキャリアープロテイン還元酵素は、特に、遺伝子組換え技術を利用した高生産系の構築に有利であり、これにより効率的に光学活性(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルを製造することが可能となった。

【0049】

【配列表】

- (1) 出願人氏名：ダイセル化学工業株式会社
- (2) 発明の名称：光学活性 4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルの製造方法
- (3) 整理番号：D1-003
- (4) 出願番号：
- (5) 出願日：
- (6) 配列の数：4

配列番号： 1

配列の長さ： 244

配列の型： アミノ酸

鎖の数： 一本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： タンパク質

配 列

Met Asn Phe Glu Gly Lys Ile Ala Leu Val Thr Gly Ala Ser Arg Gly

1 5 10 15

Ile Gly Arg Ala Ile Ala Glu Thr Leu Ala Ala Arg Gly Ala Lys Val

20 25 30

Ile Gly Thr Ala Thr Ser Glu Asn Gly Ala Gln Ala Ile Ser Asp Tyr

35 40 45

Leu Gly Ala Asn Gly Lys Gly Leu Met Leu Asn Val Thr Asp Pro Ala

50 55 60

Ser Ile Glu Ser Val Leu Glu Lys Ile Arg Ala Glu Phe Gly Glu Val

65 70 75 80

Asp Ile Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Thr Arg Asp Asn Leu Leu Met

85 90 95

Arg Met Lys Asp Glu Glu Trp Asn Asp Ile Ile Glu Thr Asn Leu Ser



100	105	110	
Ser Val Phe Arg Leu Ser Lys Ala Val Met Arg Ala Met Met Lys Lys			
115	120	125	
Arg His Gly Arg Ile Ile Thr Ile Gly Ser Val Val Gly Thr Met Gly			
130	135	140	
Asn Gly Gly Gln Ala Asn Tyr Ala Ala Ala Lys Ala Gly Leu Ile Gly			
145	150	155	160
Phe Ser Lys Ser Leu Ala Arg Glu Val Ala Ser Arg Gly Ile Thr Val			
165	170	175	
Asn Val Val Ala Pro Gly Phe Ile Glu Thr Asp Met Thr Arg Ala Leu			
180	185	190	
Ser Asp Asp Gln Arg Ala Gly Ile Leu Ala Gln Val Pro Ala Gly Arg			
195	200	205	
Leu Gly Gly Ala Gln Glu Ile Ala Asn Ala Val Ala Phe Leu Ala Ser			
210	215	220	
Asp Glu Ala Ala Tyr Ile Thr Gly Glu Thr Leu His Val Asn Gly Gly			
225	230	235	240
Met Tyr Met Val			

配列番号 : 2

配列の長さ : 735

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to genomic DNA

配列の特徴

特徴を表す記号 : CDS

存在位置 : 1 .. 735

特徴を決定した方法 : S

ATG AAT TTT GAA GGA AAA ATC GCA CTG GTA ACC GGT GCA AGC CGC GGA	48
Met Asn Phe Glu Gly Lys Ile Ala Leu Val Thr Gly Ala Ser Arg Gly	
1 5 10 15	
ATT GGC CGC GCA ATT GCT GAA ACG CTC GCA GCC CGT GGC GCG AAA GTT	96
Ile Gly Arg Ala Ile Ala Glu Thr Leu Ala Ala Arg Gly Ala Lys Val	
20 25 30	
ATT GGC ACT GCG ACC AGT GAA AAT GGC GCT CAG GCG ATC AGT GAT TAT	144
Ile Gly Thr Ala Thr Ser Glu Asn Gly Ala Gln Ala Ile Ser Asp Tyr	
35 40 45	
TTA GGT GCC AAC GGC AAA GGT CTG ATG TTG AAT GTG ACC GAC CCG GCA	192
Leu Gly Ala Asn Gly Lys Gly Leu Met Leu Asn Val Thr Asp Pro Ala	
50 55 60	
TCT ATC GAA TCT GTT CTG GAA AAA ATT CGC GCA GAA TTT GGT GAA GTG	240
Ser Ile Glu Ser Val Leu Glu Lys Ile Arg Ala Glu Phe Gly Glu Val	
65 70 75 80	
GAT ATC CTG GTC AAT AAT GCC GGT ATC ACT CGT GAT AAC CTG TTA ATG	288
Asp Ile Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Thr Arg Asp Asn Leu Leu Met	
85 90 95	
CGA ATG AAA GAT GAA GAG TGG AAC GAT ATT ATC GAA ACC AAC CTT TCA	336
Arg Met Lys Asp Glu Glu Trp Asn Asp Ile Ile Glu Thr Asn Leu Ser	
100 105 110	
TCT GTT TTC CGT CTG TCA AAA GCG GTA ATG CGC GCT ATG ATG AAA AAG	384
Ser Val Phe Arg Leu Ser Lys Ala Val Met Arg Ala Met Met Lys Lys	
115 120 125	
CGT CAT GGT CGT ATT ATC ACT ATC GGT TCT GTG GTT GGT ACC ATG GGA	432
Arg His Gly Arg Ile Ile Thr Ile Gly Ser Val Val Gly Thr Met Gly	
130 135 140	
AAT GGC GGT CAG GCC AAC TAC GCT GCG GCG AAA GCG GGC TTG ATC GGC	480

Asn Gly Gly Gln Ala	Asn Tyr Ala Ala Ala Lys Ala Gly Leu Ile Gly	
145	150	155
TTC AGT AAA TCA CTG GCG CGC GAA GTT GCG TCA CGC GGT ATT ACT GTA		528
Phe Ser Lys Ser Leu Ala Arg Glu Val Ala Ser Arg Gly Ile Thr Val		
165	170	175
AAC GTT GTT GCT CCG GGC TTT ATT GAA ACG GAC ATG ACA CGT GCG CTG		576
Asn Val Val Ala Pro Gly Phe Ile Glu Thr Asp Met Thr Arg Ala Leu		
180	185	190
AGC GAT GAC CAG CGT GCG GGT ATC CTG GCG CAG GTT CCT GCG GGT CGC		624
Ser Asp Asp Gln Arg Ala Gly Ile Leu Ala Gln Val Pro Ala Gly Arg		
195	200	205
CTC GGC GGC GCA CAG GAA ATC GCC AAC GCG GTT GCA TTC CTG GCA TCC		672
Leu Gly Gly Ala Gln Glu Ile Ala Asn Ala Val Ala Phe Leu Ala Ser		
210	215	220
GAC GAA GCA GCT TAC ATC ACG GGT GAA ACT TTG CAT GTG AAC GGC GGG		720
Asp Glu Ala Ala Tyr Ile Thr Gly Glu Thr Leu His Val Asn Gly Gly		
225	230	235
ATG TAC ATG GTC TGA		735
Met Tyr Met Val		

配列番号 : 3

配列の長さ : 36

配列の型 : 核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

AAAGGATCCA ACAATGAATT TTGAAGGAAA AATCGC

36

配列番号 : 4

配列の長さ : 32

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配 列

TGCCTCGAGT TATCAGACCA TGTACATCCC GC

32

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 効率的な(S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルの製造方法を提供することを課題とする。

【解決手段】 II型の脂肪酸合成酵素に含まれる $\beta$ -ケトアシル-ACP還元酵素の単離、およびその4-ハロアセト酢酸エステル還元活性の検討を行った結果、該酵素が、(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルに対し極めて高い還元活性および立体選択性を有することを見いだした。また、該酵素が、4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルエステルに対しては、いずれの立体配置に対してもほとんど酸化活性を示さず、4-クロロアセト酢酸エチルに対しては還元のみを行うことを見出した。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ  
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000002901

【住所又は居所】 大阪府堺市鉄砲町1番地

【氏名又は名称】 ダイセル化学工業株式会社

【代理人】 申請人

【識別番号】 100102978

【住所又は居所】 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階  
清水国際特許事務所

【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】 100108774

【住所又は居所】 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階  
清水国際特許事務所

【氏名又は名称】 橋本 一憲

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000002901]

1. 変更年月日	1990年 8月28日
[変更理由]	新規登録
住 所	大阪府堺市鉄砲町1番地
氏 名	ダイセル化学工業株式会社